

氏名	小 山 潤
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲第 565 号
学位授与年月日	平成 31 年 3 月 20 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学位論文名	MPC ポリマーを用いた歯科用修復物の <i>in situ</i> 防汚処理
論文審査委員	(委員長) 教授 吉 村 浩太郎 (委員) 教授 西 村 智 准教授 渡 邊 真 弥

論文内容の要旨

1 研究目的

エナメル質、象牙質に対する優れた接着性、また、修復による審美性が高いことから、齲蝕治療では歯科用修復物としてコンポジットレジン(CR)が広く使用されている。しかし、齲蝕原因菌である *Streptococcus mutans (S.mutans)* などによる糖代謝で産生される酸が、歯質と CR の間隙に侵入して歯質が脱灰することで二次齲蝕を起こすことが問題となっている。充填された CR の周囲の歯質が二次齲蝕に罹患するとさらなる窩洞形成により歯質の欠損が大きくなり、齲蝕が歯髄にまで及んでいる場合は麻酔抜髄に至り、その後は根尖病巣や歯根破折による抜歯にまで至る可能性が生じる。齲蝕原因菌が存在するデンタルプラークはタンパク質の吸着が引き金となり形成される。したがって、齲蝕の二次発生を抑制するためには CR 表面でタンパク質が安定な吸着層とならないようにすることが極めて重要である。本研究では細胞膜に存在するリン脂質の極性基と類似した構造を持ち同じ化学構造を分子内に有し、タンパク質吸着や細胞接着、細菌付着を阻止することが期待できる 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)ポリマーに着目した。MPC ポリマーは人工心臓や人工股関節、コンタクトレンズ等に臨床応用され、安全性の担保がなされているバイオマテリアルである。この MPC ポリマーを用いて CR を表面処理することでタンパク質吸着、細菌付着、バイオフィルムの形成が抑制されて二次齲蝕発生の可能性を低減できると考えた。その表面処理法を確立させることが本研究の目的である。光重合した CR の一部には未反応の重合性基が残存している。重合性基である炭素-炭素二重結合 ($\text{CH}_2=\text{CR}_1\text{R}_2$) を有する MPC ポリマーを CR 表面に塗布して光照射することで、CR 表面に MPC ポリマーが化学結合される。口腔内で CR に MPC ポリマーを結合させ、タンパク質吸着、細菌付着、バイオフィルム形成を抑制するような表面処理法の構築を目的とする。口腔内で処理するためには、短時間かつ簡便な操作、口腔内軟組織に対して低侵襲な溶媒の選択、口腔内は常に湿潤状態にあるため防湿下での表面処理が必要となる。

また、口腔内環境維持のために、歯ブラシによるブラッシングを行う。歯ブラシによる CR 表面に修飾された MPC ポリマーの剥離による防汚性の低下が懸念される。歯ブラシを用いた摺動試験を行い、摺動後の CR 基板の表面特性について解析を行うことで CR 表面に化学結合した MPC ポリマーの物理的耐久性の評価を行うことも本研究の目的である。

2 研究方法

CR に表面処理を行うために使用する MPC ポリマーを自ら合成して得た。得られた MPC ポリマーに対してフーリエ変換赤外分光法(FT-IR)、核磁気共鳴分光法(NMR)を用いて MPC ポリマーの有する官能基と構造の解析を行った。

MPC ポリマーと重合開始剤(カンファークイノン)をエタノールに溶解させた溶液を CR 表面に小筆を用いて塗布し、実際の臨床で使用する光照射器で光照射して光化学反応させた後、エタノールで洗浄したものを解析用の基板とした。表面処理を行った CR の表面解析を行うために X 線光電子分光法(XPS)、水中での空気の静的接触角の測定、 μ BCA 法によるタンパク質吸着量測定を行った。XPS では MPC ポリマーの特徴的な構成元素である窒素およびリン原子のピークを確認することで CR 表面に MPC ポリマーが適切に表面処理されているかを評価した。静的接触角の測定では MPC ポリマーで表面処理を行った CR の親水性の評価、さらに CR 表面のタンパク質吸着抑制能の評価を唾液中に多く存在する糖タンパク質のムチンを使って行った。また、CR 表面の細菌(*S.mutans*)付着能とバイオフィーム形成能の評価およびバイオフィーム形成試験も行った。これらの試験では走査型電子顕微鏡(SEM)を用いての CR 表面の細菌の付着状態、バイオフィームの形成状態の観察による定性的評価、希釈平板法での細菌コロニーの計数、分光光度計を用いたバイオフィーム懸濁液の濁度測定による定量的な評価を行った。ブラッシング操作が CR の表面特性に与える影響に関しては摩擦・摩耗試験機による歯ブラシ摺動試験を行うことで確認した。歯ブラシで摺動させた CR を試料として用いて上記と同様に μ BCA 法によるタンパク質吸着測定、細菌付着試験、バイオフィーム形成試験を行うことで、口腔内での使用を前提とした MPC ポリマーの防汚性と物理的耐久性の評価を行った。

3 研究成果

合成して得た MPC ポリマーの構造に CR 表面との結合に必要な重合性基である炭素-炭素二重結合($\text{CH}_2=\text{CR}_1\text{R}_2$)が含まれていることを FT-IR にて確認できた。また、CR 表面の炭素-炭素二重結合($\text{CH}_2=\text{CR}_1\text{R}_2$)の有無についても同様に FT-IR にて評価を行ったところ、その存在が確認された。

この MPC ポリマーを用いて表面処理を行った CR 表面に対して XPS による表面の元素分析を行ったところ、MPC ポリマーの特徴的な構成元素である窒素およびリン原子のピークが確認された。このことから、CR 表面に MPC ポリマーが適切に表面処理されたことが示された。静的接触角測定では、口腔内は常に湿潤状態にあるため水中での空気の接触角測定を行った。その結果、MPC ポリマーで表面処理した CR 表面は、未処理の CR 表面と比較して高い親水性を示した。さらに、MPC ポリマーで表面処理を行うことで CR 表面はタンパク質吸着が有意に低減することが示された。また、細菌付着試験、バイオフィーム形成試験では SEM 観察による定性的評価、希釈平板法、分光光度計を用いたバイオフィーム懸濁液の濁度測定による定量的評価を行ったが、MPC ポリマーで CR の表面処理を行うことで細菌付着、バイオフィーム形成が抑制されることも示された。一方で、歯ブラシによる摺動後は MPC ポリマーで CR 表面を修飾した場合でもタンパク質吸着量、細菌付着量、バイオフィーム形成量のいずれも増加を認めた。

4 考察

MPC ポリマーにて表面処理を行った CR 表面における水中での接触角測定で表面処理後の CR 表面で高い親水性が得られたのは、水中で CR 表面に親水性の MPC ユニットの側鎖であるホスホリルコリン基が配向したためと考えられる。また、タンパク質吸着や細菌付着を抑制し、さらにバイオフィルムの形成が阻止されたことは、CR 表面に親水基が存在することで生体反応の起因となるタンパク質と CR 表面との疎水性相互作用が生じにくいことによる。さらには、MPC ポリマーの表面電位は -0.4 mV とほぼゼロである。したがって、タンパク質や細菌とは直接的な静電的相互作用が生じない。一方、摺動後の CR 表面のタンパク質吸着量などの増加は、歯ブラシでの摺動により CR 表面が摩耗し、修飾された MPC ポリマー層が剥離されたためと考えられる。医科領域では前に述べたように MPC ポリマーは既に臨床応用されているが、これまでに歯科領域においては MPC ポリマーを使用した生体材料についての報告は少なく、特に CR 表面と MPC ポリマーとの化学結合に関する報告は渉猟する限り認められない。また、MPC ポリマーは歯科領域では未だに臨床応用されていない。CR 表面に残存する未反応の重合性基($\text{CH}_2=\text{CR}_1\text{R}_2$)と同様の重合性基を導入した MPC ポリマーを合成し、この溶液を CR 表面に塗布して光照射することで CR 表面に MPC ポリマーを化学結合させるという表面処理法は新規性があり、本研究の特色・独創的な点である。

5 結論

光照射を行うことで光化学反応によって MPC ポリマーを CR 表面に結合させることができた。これらの表面処理された CR 表面は高い親水性、タンパク質吸着、細菌付着、バイオフィルム形成抑制能を示した。

物理的耐久性の点ではまだ課題点が残るが、本研究で CR 表面の新たな防汚処理法を確立させることができた。本研究は歯科用修復物の優れた防汚処理技術の開発に繋がり、国民の口腔内環境維持に貢献することが期待できる。また、MPC ポリマーを用いた CR 表面処理法は、実際の臨床での歯科治療に応用できるものである。

論文審査の結果の要旨

本論文では、新しい合成ポリマーを開発して、歯科用の修復物としての有用性について検証を行った。人工歯の材料である CR に塗布して、光化学反応により表面に結合させることができた。その表面は高い親水性を示し、さらにタンパク吸着、細菌付着、バイオフィルム形成を抑制する機能を確認できた。物理的な長期的耐久性、自然歯との親和性（吸着性）においては、まだ課題が残るが、CR 表面の防汚処理についての新しいアプローチを提示することができた。

論文審査では、一般にわかりやすく背景や考察に説明を加えること、残された課題について明示すること、統計や方法についての記述の追加、グラフの統計に関する説明を追加すること、などの改訂を求め、すべてが適切に改善されたため、合格と判断した。

最終試験の結果の要旨

本論文では、新しく開発した合成ポリマーが、歯科用の防汚用コーティング剤として、臨床的にも一定の有用性があることを示した。物理的な長期的耐久性、自然歯との親和性（吸着性）においての課題は残るものの、CR 表面の防汚処理についての新しいアプローチを提示し、今後さらに利用価値の高い材料の開発につながる可能性を示すことができた。

研究プレゼンでは、研究内容の詳細について適切かつ要領を得た説明を行い、質疑においても、本研究に関する十分な専門知識と実際の経験を示すことができた。論文も英文雑誌に投稿し、**Revise** の査定結果をもらって、論文の改訂について鋭意努力していることが確認された。

以上より、申請者の学識および研究能力は学位授与に充分値するものと審査委員全員一致で判断した。